

Trennung vom markierten Trijodthyronin und Thyroxin mit Hilfe der Gelfiltrationsmethode

Von G. GYERTYÁNYFI, J. FÖLDES und EVA KOLLIN

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. I. Magyar) Budapest, Ungarn

(Eingegangen am 19. Oktober 1970)

Die geeignetsten Versuchsbedingungen zur Trennung des im Serum vorhandenen markierten Trijodthyronins und Thyroxins wurden ermittelt. Die Auswirkung der Dimensionen der Gelfiltrationssäule sowie der Menge der auf das Gelbett aufgetragenen Substanz auf die Trennungsergebnisse wurden überprüft. Zugleich wurde die Verlässlichkeit der Methode anhand von mehreren Modellversuchen kontrolliert. Das von den Autoren ausgearbeitete Verfahren wurde auch in der Praxis, und zwar zur Ermittlung des Verhältnisses von Trijodthyronin und Thyroxin im Serum von Hyperthyreose-Kranken angewandt. Die Strahlenbelastung der Kranken ist bei Anwendung dieser Methode gering; die Methode eignet sich daher für Routineuntersuchungen.

The separation of labelled triiodothyronine and thyroxine by gel filtration

The optimal conditions for the separation of labelled triiodothyronine and thyroxine in serum were studied. The effects on the separation of the dimensions of the gel column and the amount of material added were tested, and the reliability of the method was checked in several model separations. The method used here has been used in practice, e. g., for the determination of the ratio of triiodothyronine and thyroxine in hyperthyreotic patients. Since the irradiation dose for the patient is very low, the method is suitable for routine investigations.

Die Bestimmung des Verhältnisses und der prozentualen Verteilung der in der Peripherie zirkulierenden Schilddrüsenhormone — des Thyroxins und Trijodthyronins — ist theoretisch und praktisch gleich wichtig. Die dafür ursprünglich verwendeten papierchromatographischen und dünnschichtchromatographischen Verfahren haben den Nachteil, daß die erwähnten Verbindungen vor der chromatographischen Entwicklung aus dem Serum isoliert werden müssen; während dieses Vorganges kommt es mitunter zum chemischen Zerfall, insbesondere zur Dejodierung. TAUROG und Mitarbeiter haben nachgewiesen, daß diese Hormone während der papierchromatographischen Entwicklung auch spontan dejodiert werden können (1, 2). Daher suchte man neue Methoden zur Trennung dieser Hormone und begann hierzu in letzter Zeit die Gelfiltrationsmethode heranzuziehen (3—6).

Eine der Grundlagen der Gelfiltrationsmethode bildet der Molekularsiebeffekt der Gele. Außerdem werden die einzelnen Verbindungen unterschiedlich adsorbiert, die Trennung wird daher von beiden Faktoren beeinflusst. Zwischen den Molekulardimensionen des Thyroxins und Trijodthyronins und ihrem Adsorptionsvermögen besteht kein Größenunterschied (7), so daß ihre Trennung nur mit Hilfe einer größeren Säule vorgenommen werden kann.

Von den Versuchen MONGEY's und MASON's (3) ausgehend untersuchten wir, welche Gelfiltrationsmethode sich zur Trennung des markierten Trijodthyronins und Thyroxins am besten eignet, und welche Versuchsbedingungen die zweckmäßigsten sind. Die erzielten Ergebnisse haben wir auch in der Praxis angewandt.

Methodik und Versuchsergebnisse

Reagenzien

Sephadex G-25 „fine“, Dextrangel (Pharmacia, Uppsala)
 ^{125}I -Trijodthyronin und ^{125}I -Thyroxin (Philips-Duphar)
 ^{125}I -Monojodtyrosin und ^{125}I -Dijodtyrosin (Philips-Duphar)
0,01N NaOH
„Fractionat“, automatischer Fraktionssammler („Labor“ MIM)
GOM NK-108, energiselektiver Zähler.

Herstellung der Gelfiltrationssäule

Das Sephadex G-25 Dextrangel wird in 0,01N NaOH suspendiert, dreimal dekantiert, und aus dieser Suspension nach 24stdg. Stehen die Gelfiltrationssäule hergestellt.

Gelfiltration des markierten Trijodthyronins und Thyroxins

Zur Untersuchung wurde eine 25 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 1,5 cm verwendet. Aus dem markierten Isotopenpräparat wurde mit 0,01N NaOH eine Lösung mit der spezifischen Aktivität von 0,1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ angefertigt; 1 ml dieser Lösung wurde auf das Gelbett aufgetragen, und 1 ml diente als Standard. Nachdem die aufgetragene Lösung ins Gel eingezogen war, wurde mit 5 ml 0,01N NaOH nachgewaschen und dafür gesorgt, daß die Waschflüssigkeit abtropfte. Nachher wurde die Säule auf den automatischen Fraktionssammler gebracht, und die Elution mit 0,01N NaOH durchgeführt.

Während der Gelfiltration sammelten wir 50 5 ml-Fractionen, deren Aktivität im Bohrlöchkristall mit Hilfe des energiselektiven Zählers gemessen wurde.

Die Ergebnisse unserer Messungen werden in Tabelle 1 veranschaulicht. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Wiederfindung vollständig ist.

Bei der Gelfiltration des markierten Trijodthyronins gewannen wir ein Chromatogramm, das zwei Gipfel enthielt. Der erste, kleine Gipfel entsprach dem an-

Tab. 1

Gelfiltration von ^{125}I -Trijodthyronin und ^{125}I -Thyroxin auf einer 25 \times 1,5 cm großen Säule
Aufgetragene Substanzmenge: 1 ml
Die angegebenen Werte sind Durchschnittsergebnisse von je 5 Versuchen

Verbindung	Angaben	\bar{x} %	Bereich %	$S_{\bar{x}}$
^{125}I -Trijodthyronin	Wiederfindung	98,24	97,54—98,91	$\pm 0,40$
	I ⁻	2,66	1,44—4,55	$\pm 1,30$
	^{125}I -Trijodthyronin	95,98	91,80—98,53	$\pm 1,33$
	^{125}I -Thyroxin	1,22	0—3,65	$\pm 1,22$
^{125}I -Thyroxin	Wiederfindung	101,69	99,40—102,94	$\pm 1,15$
	I ⁻	7,90	4,84—11,83	$\pm 2,06$
	^{125}I -Trijodthyronin	3,86	2,47—5,26	$\pm 0,81$
	^{125}I -Thyroxin	88,20	82,90—92,69	$\pm 2,86$

organischen Jodid, der zweite, der die aufgetragene Substanzmenge fast ganz einschloß, entsprach dem markierten Trijodthyronin. Bei der Gelfiltration des markierten Thyroxins kam ebenfalls ein zwei Gipfel enthaltendes Chromatogramm zustande, von denen der erste, kleine Gipfel wieder das anorganische Jodid, der zweite, größere das anwesende markierte Thyroxin bedeutete. Bei der Gelfiltration beider Verbindungen konnte in geringfügiger Menge eine Thyroxinverunreinigung im Trijodthyronin bzw. eine Trijodthyroninverunreinigung im Thyroxin nachgewiesen werden.

Trennung des Gemisches von ^{125}I -Trijodthyronin und ^{125}I -Thyroxin

Nachdem die Gelfiltrationsentwicklung des ^{125}I -Trijodthyronins und ^{125}I -Thyroxins erfolgreich war, nahmen wir die Trennung des Gemisches dieser zwei Verbindungen in Angriff. Zwei Fragen beschäftigten uns vor allem:

1. Wie lang muß die Säule sein, um eine optimale Trennung zu erzielen?
2. Welche Substanzmenge läßt sich, unter Beibehaltung einer optimalen Trennung maximal auf das Gelbett auftragen? Diese Frage ist deshalb wichtig, da es bei Erhöhung der aufgetragenen Substanzmenge möglich ist, die spezifische Aktivität zu vermindern.

Zu Beginn unserer Versuche gingen wir wie oben vor und bedienten uns einer 25 cm langen Säule mit einem Durchmesser von 1,5 cm sowie 0,01N NaOH. Aus der verdünnten ^{125}I -Trijodthy-

ronin- und ^{125}I -Thyroxin-Stammlösung fertigten wir ein Gemisch mit der spezifischen Aktivität von 0,07—0,2 $\mu\text{C}/\text{ml}$ an, von dem wir 1 ml auf das Gelbett auftrugen, 1 ml diente als Standard. Die ^{125}I -Trijodthyronin- und ^{125}I -Thyroxin-Menge wurde so eingestellt, daß ihr Verhältnis zueinander annähernd 1:1 betrug. Weiterhin gingen wir wie oben vor.

Der obere Teil von Tabelle 2 und Abbildung 1 veranschaulichen unsere Ergebnisse. Das gewonnene Chromatogramm enthält drei Gipfel. Der erste, kleinere Gipfel bedeutet das anwesende anorganische Jodid, der zweite entspricht dem ^{125}I -Trijodthyronin und der

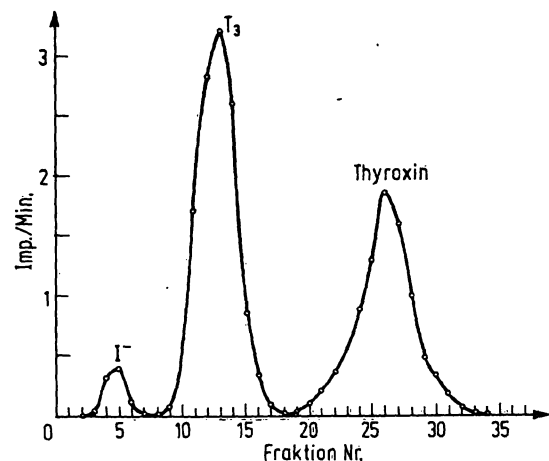


Abb. 1

Elutionsdiagramm eines Gemisches von Trijodthyronin und Thyroxin

dritte dem ^{125}I -Thyroxin. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß zwischen der prozentualen Menge des aufgetragenen und eluierten ^{125}I -Thyroxins und ^{125}I -Trijodthyronins, obwohl die Wiederfindung vollständig ist, eine sehr große Abweichung besteht. Aufgrund der t-Verteilung nahmen wir auch statistische Berechnungen vor, um zu ermitteln, wieviel Prozent die Wahrscheinlichkeit besitzt, daß die Abweichung den $\pm 5\%$ -Wert überschreitet. Nach unseren Berechnungen ergab sich dies mit einer Wahrscheinlichkeit von 99%, woraus hervorgeht, daß sich 25 cm lange Säulen mit einem Durchmesser von 1,5 cm nicht für unsere Zwecke eignen.

In der Folge verwendeten wir zur Trennung des genannten Gemisches eine 35 cm lange Säule mit einem Durchmesser von

Tab. 2
Trennung des Gemisches von ^{125}I -Trijodthyronin (^{125}I -T₃) und ^{125}I -Thyroxin (^{125}I -T₄)

Versuch	Anzahl der Versuche	Angaben	\bar{x} %	Bereich %	$S_{\bar{x}}$
Säulendimension: 23 \times 1,5 cm Aufgetragene Substanzmenge: 1 ml	20	Wiederfindung	102,74	96,04—105,95	$\pm 0,70$
		I ⁻	1,40	1,26—4,06	$\pm 0,10$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₃	$\pm 7,71$	0,40—17,49	$\pm 1,13$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₄	$\pm 7,81$	0,40—17,49	$\pm 1,04$
Säulendimension: 35 \times 1,5 cm Aufgetragene Substanzmenge: 1—5 ml	15	Wiederfindung	98,47	95,16—104,90	$\pm 1,06$
		I ⁻	4,06	2,32—5,37	$\pm 0,40$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₃	$\pm 3,10$	1,41—5,20	$\pm 0,37$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₄	$\pm 2,57$	0,24—5,20	$\pm 0,55$
Säulendimension: 45 \times 1,5 cm Aufgetragene Substanzmenge: 5 ml	5	Wiederfindung	95,21	94,10—96,30	$\pm 0,81$
		I ⁻	5,59	3,96—6,10	$\pm 0,45$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₃	$\pm 7,38$	6,11—8,43	$\pm 2,21$
		Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₄	$\pm 7,38$	6,06—8,52	$\pm 1,96$

1,5 cm. Auf das Gelbett wurde 1 ml der Lösung mit der spezifischen Aktivität von 0,03–0,08 $\mu\text{C}/\text{ml}$ aufgetragen, wobei das Verhältnis von Trijodthyronin und Thyroxin nahezu 1:1 betrug. Nach Erzielung befriedigender Ergebnisse setzten wir unsere Untersuchung fort, indem wir auch die Prüfung der Wirkung der aufgetragenen Substanzmenge mit einbezogen. Auf die Gelfiltrationssäule wurden 1–5 ml der zu trennenden Substanz aufgetragen.

Das gewonnene Chromatogramm entsprach der Abbildung 1. Die Zahlenwerte werden durch den mittleren Teil von Tabelle 2 veranschaulicht. Bei einer fast vollständigen Wiederfindung übertrifft der Unterschied zwischen der auf das Gelbett aufgetragenen und der eluierten ^{125}I -Trijodthyronin- und ^{125}I -Thyroxin-Menge den $\pm 5\%$ -Wert nicht. Auch die aufgrund der t-Verteilung vorgenommenen statistischen Berechnungen bestätigen diese Feststellung mit 99% Wahrscheinlichkeit.

Zur Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin erweisen sich also 35 cm lange Säulen mit einem Durchmesser von 1,5 cm als am geeignetsten.

Bei der Fortsetzung unserer Versuche änderten wir das Verhältnis von Trijodthyronin und Thyroxin, das wir auf die Werte 1:2 und 2:1 einstellten. In jedem Fall erzielten wir entsprechende Ergebnisse.

Endlich führten wir die Untersuchungen bei gleichen Versuchsbedingungen ergänzend auch mit einer 45 cm langen Säule mit einem Durchmesser von 1,5 cm durch. Wir trugen auf die Säule 5 ml eines Gemisches auf, in dem das Verhältnis von Trijodthyronin zu Thyroxin 1:1 betrug.

Die Ergebnisse lassen sich im unteren Teil der Tabelle 2 ablesen. Zwischen der prozentualen Menge des aufgetragenen und eluierten Trijodthyronins und Thyroxins ergab sich jedoch in jedem einzelnen Fall eine größere Abweichung als $\pm 5\%$, so daß auch diese Säule unseren Zwecken nicht entspricht.

Trennung von ^{125}I -Trijodthyronin und ^{125}I -Thyroxin aus Serum

Hierauf wandten wir uns dem eigentlichen Zweck unserer Untersuchungen, der Trennung des im Serum anwesenden markierten Trijodthyronins und Thyroxins, zu.

Zu diesem Zweck setzten wir dem Serum ein Trijodthyronin- und Thyroxin-Gemisch von verschiedenem Verhältnis (1:1, 1:2, 2:1) zu und inkubierten das so erhaltene Gemisch 1 Std. bei 37° ; dann gaben wir 0,01N NaOH zu und inkubierten das Gemisch eine weitere Stunde bei 37° . Nachher trugen wir 5 ml des Gemisches auf das $35 \times 1,5$ cm große Dextranbett auf, während andere 5 ml als Standard dienten. Die Elution von der Säule und die Messung wurden wie oben beschrieben vorgenommen.

Das so erhaltene Chromatogramm enthält 4 Gipfel, wie aus Abbildung 2 hervorgeht. Der erste Gipfel entspricht dem an Eiweiß gebundenen Jod, der zweite dem anorganischen Jodid, der dritte dem markierten Trijodthyronin und der vierte Gipfel dem markierten Thyroxin.

Die Zahlenwerte wurden in Tabelle 3 zusammengefaßt. Aus den Daten ist ersichtlich, daß sich die $35 \times 1,5$ cm große Säule zur Trennung des im Serum anwesenden markierten Trijodthyronins und Thyroxins eignet.

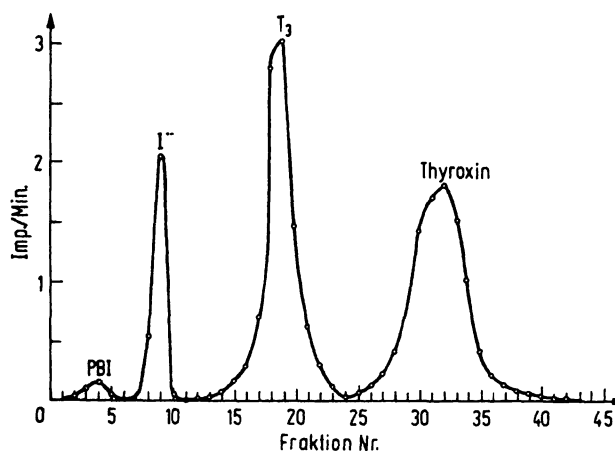


Abb. 2
Elutionsdiagramm des mit Serum inkubierten Gemisches von Trijodthyronin und Thyroxin

Tab. 3
Trennung des Gemisches von mit Serum inkubierten ^{125}I -Trijodthyronin (^{125}I -T₃) und ^{125}I -Thyroxin (^{125}I -T₄) als Durchschnittsergebnis von 9 Versuchen

Angaben	\bar{x} %	Bereich %	S \bar{x}
Wiederfindung	99,46	95,76–104,54	+0,91
PBI	2,54	1,15–4,91	$\pm 0,53$
I ⁻	7,41	0,42–8,82	$\pm 0,44$
Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₃	$\pm 1,69$	0,17–3,51	$\pm 0,68$
Differenz zwischen dem aufgetragenen und eluierten ^{125}I -T ₄	$\pm 1,16$	0,15–4,28	$\pm 0,79$

Kontrolle der Verlässlichkeit der Methode

Im Serum sind außer Trijodthyronin und Thyroxin auch Monojodtyrosin und Dijodtyrosin anwesend; wir hielten es daher für notwendig zu kontrollieren, ob diese nicht die Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin beeinflussen. Außerdem überprüften wir mit Hilfe einer anderen Trennungsmethode die Richtigkeit der mittels des Gelfiltrationsverfahrens gewonnenen Angaben. Zu diesem Zweck führten wir die folgenden Untersuchungen durch:

1. Untersuchung des Einflusses von Monojodtyrosin und Dijodtyrosin.
2. Kontrolle der mit Gelfiltration gewonnenen Ergebnisse anhand des papierchromatographischen Verfahrens.

Untersuchung des Einflusses von Monojodtyrosin und Dijodtyrosin

Zunächst nahmen wir die Gelfiltration des reinen ^{125}I -Monojodtyrosins bzw. des ^{125}I -Dijodtyrosins auf einer $35 \times 1,5$ cm großen Säule vor. Aus der Stammlösung der markierten Tyrosine stellten wir mit 0,01N NaOH eine Lösung mit der spezifischen Aktivität von 0,02 $\mu\text{C}/\text{ml}$ her, von der wir 5 ml auf das Gelbett auftrugen, während 5 ml als Standard dienten. Elution und Messung wurden auf die übliche Art und Weise durchgeführt.

Das gewonnene Chromatogramm wies einen einzigen großen Gipfel auf, der dem markierten Mono- oder Dijodtyrosin und dem mit diesen gemeinsam eluierten anorganischen Jodid entsprach.

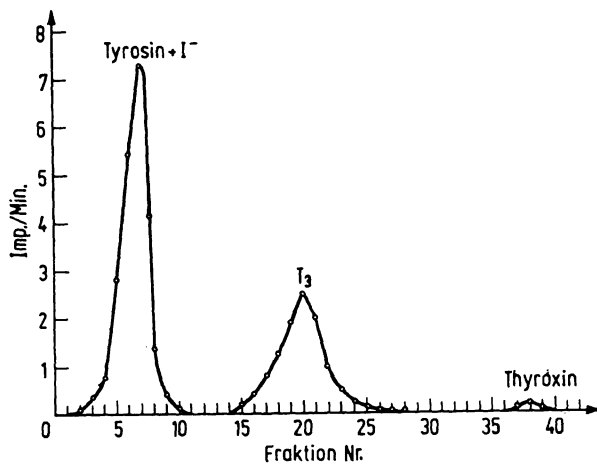


Abb. 3

Elutionsdiagramm des Gemisches von Tyrosinen und Trijodthyronin

Hierauf stellten wir aus dem markierten Tyrosin und dem markierten Trijodthyronin ein Gemisch im Verhältnis 2:1 her, von dem wir 5 ml auf die Gelfiltrationssäule auftrugen, um im folgenden auf die übliche Art und Weise vorzugehen.

Unsere Messungen ergaben das in Abbildung 3 veranschaulichte Chromatogramm. Dieses weist zwei Gipfel auf; der erste Gipfel entspricht dem markierten Tyrosin und dem mit diesem gleichzeitig abgelösten anorganischen Jodid, der zweite Gipfel entspricht dem markierten Trijodthyronin.

Tab. 4

Gelfiltrationsergebnisse von ^{125}I -Monojodtyrosin ($\text{M } ^{125}\text{IT}$) und ^{125}I -Dijodtyrosin ($\text{D } ^{125}\text{IT}$)

Versuche	Angaben	\bar{x} %
Gelfiltration von $\text{M } ^{125}\text{IT}$	Wiederfindung $\text{M } ^{125}\text{IT} + \text{I}^-$	98,89 99,25
Gelfiltration des Gemisches von $\text{M } ^{125}\text{IT}$ und $^{125}\text{I}-\text{T}_3$	Wiederfindung $\text{M } ^{125}\text{IT} + \text{I}^-$ Differenz zwischen aufgetragenem und eluiertem $\text{M } ^{125}\text{IT}$ Differenz zwischen aufgetragenem und eluiertem $^{125}\text{I}-\text{T}_3$	98,25 60,98 +2,88 $\pm 2,83$
Gelfiltration von $\text{D } ^{125}\text{IT}$	Wiederfindung $\text{D } ^{125}\text{IT} + \text{I}^-$	97,88 98,87
Gelfiltration des Gemisches von $\text{D } ^{125}\text{IT}$ und $^{125}\text{I}-\text{T}_3$	Wiederfindung $\text{D } ^{125}\text{IT} + \text{I}^-$ Differenz zwischen aufgetragenem und eluiertem $\text{D } ^{125}\text{IT}$ Differenz zwischen aufgetragenem und eluiertem $^{125}\text{I}-\text{T}_3$	96,69 63,15 +3,08 $\pm 2,95$

Die Zahlenwerte sind aus Tabelle 4 ersichtlich. Das markierte Mono- und Dijodtyrosin wurde zugleich mit dem anorganischen Jodid eluiert. Die Menge der auf das Gelbett aufgetragenen und von diesem abgelösten Tyrosine war innerhalb der Versuchsfehlergrenze identisch, so daß ihre Anwesenheit die Trennung der Thyronine nicht beeinflusst.

Endlich kontrollierten wir mit Hilfe der Isotopendoppelmarkierung, ob die markierten Tyrosine tatsächlich zugleich mit dem anorganischen Jod eluiert werden. Zu diesem Zweck unterzogen wir die mit ^{125}I markierten Tyrosine, nach Vermischen mit $\text{Na } ^{131}\text{I}$, der Gelfiltrationsmethode.

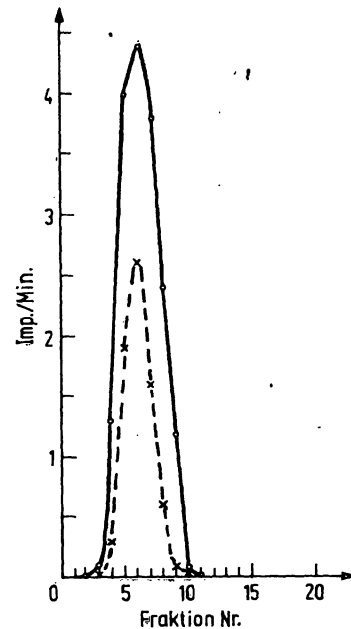


Abb. 4

Elutionsdiagramm des Gemisches von anorganischem Jod ($\times - - \times$) und Tyrosinen ($\bullet - \bullet$)

Das in Abbildung 4 veranschaulichte Chromatogramm zeigt, daß das anorganische Jod tatsächlich in einem Gipfel mit den markierten Tyrosinen eluiert wird. Das im Serum anwesende Mono- und Dijodtyrosin stören also die Trennung und Bestimmung des Trijodthyronins und Thyroxins nicht.

Kontrolle der mit Gelfiltration gewonnenen Ergebnisse anhand des papierchromatographischen Verfahrens

Nachdem erwiesen war, daß die im Serum anwesenden Tyrosine die Trennung der Thyronine nicht stören, kontrollierten wir papierchromatographisch die mittels Gelfiltrationsmethode gewonnenen Ergebnisse der Trijodthyronin-Thyroxin-Trennung. Wir stellten für die Papierchromatographie und die Gelfiltration ein gemeinsames Gemisch aus markiertem Trijodthyronin her. Die papierchromatographische Entwicklung nahmen wir nach ROCHE und Mitarbeitern (8) sowie KERTAI und Mitarbeitern (9) vor. Als Trennungsmittel wurden n -Butanol und $2\text{N NH}_4\text{OH}$ verwendet. Für die Papierchromatographie stellten wir eine Lösung mit der spezifischen Aktivität von $15-20 \mu\text{C/ml}$ her, die wir mit $0,01\text{N NaOH}$ auf die der Gelfiltration entsprechende spezifische Aktivität verdünnten.

Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen werden in Tabelle 5 veranschaulicht. Die mit beiden Methoden gewonnenen Werte stimmen gut überein.

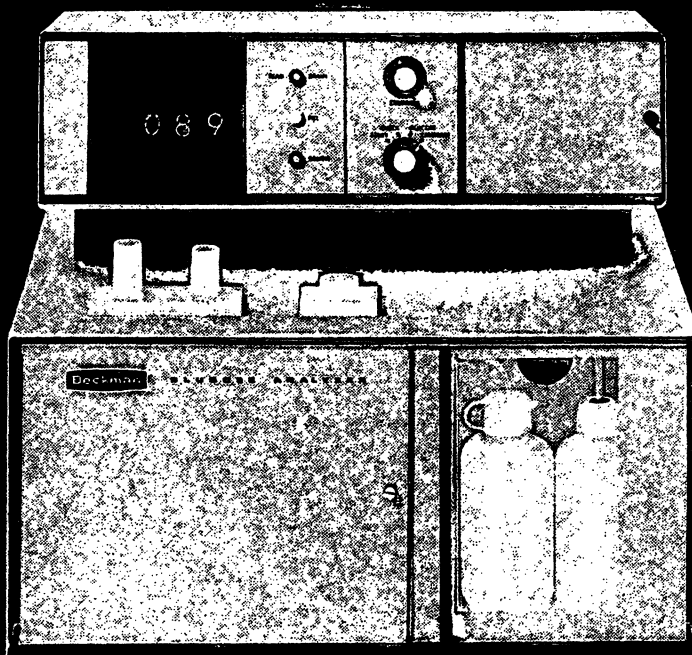
Tab. 5

Trennungsergebnisse des Gemisches von ^{125}I -Trijodthyronin ($^{125}\text{I}-\text{T}_3$) und ^{131}I -Thyroxin ($^{131}\text{I}-\text{T}_4$) bei Anwendung der Gelfiltrations- und der papierchromatographischen Methode

Verhältnis von T_3 zu T_4	Verbindung	Eingesetzte Substanz (%)	Wiedergefundene Substanz (%)	
			Nach Gelfiltration	Nach Papierchromatographie
1:1	$^{125}\text{I}-\text{T}_3$	51,83	48,71	52,27
	$^{131}\text{I}-\text{T}_4$	45,53	46,69	48,08
	$^{125}\text{I}-\text{T}_3$	67,94	65,67	68,13
2:1	$^{125}\text{I}-\text{T}_3$	32,84	33,77	36,85
	$^{131}\text{I}-\text{T}_4$	34,05	37,30	38,13
	$^{125}\text{I}-\text{T}_3$	60,95	57,80	61,27

Wie lange dauert bei Ihnen
eine wahre Glukose-Bestimmung?

Wir benötigen nur 10 Sekunden...



... mit dem neuen **Beckman-Glukose-Analysator Modell ERA-2001**
durch Anwendung einer völlig neuen Meßtechnik.

Unser Gerät ermittelt die wahre Glukose durch polarographische Messung der Abnahmegeschwindigkeit des Sauerstoffs während der enzymatischen Oxydation.

Weitere überzeugende Argumente:

- Mikroliter-Proben
10 µl Serum oder Plasma bzw. 50 µl Urin
- Ohne Enteiweißung oder Probenverdünnung

- Digitale Anzeige der Meßwerte in mg % Glukose
- Meßgenauigkeit $\pm 2\%$
Linearität der Anzeige bis 400 mg %
- Außerordentlich günstiger Preis

Beckman®

BECKMAN INSTRUMENTS GMBH

8 München 45, Frankfurter Ring 115, Tel. 3 88 71, Telex 05-23823

Technische Büros: Berlin, Tel. 3 12 10 35; Hamburg, Tel. 51 95 54; Hannover, Tel. 66 39 92; Düsseldorf, Tel. 68 44 93; Frankfurt, Tel. (06103) 10 03; Stuttgart, Tel. 71 18 37; München, Tel. 68 50 35
Internationale Niederlassungen: Fullerton/USA, Genf, Paris, Glenrothes/Schottland, Tokio, Kapstadt, Wien, Amsterdam, Stockholm



Seien Sie anspruchsvoller bei Ihren Forschungs- und Routinearbeiten

nützen Sie die neuesten Möglichkeiten aus dem Programm **PYE UNICAM**

Das weiterentwickelte Atomabsorptions-Spektralphotometer SP 90 Serie 2 basiert auf dem Prinzip des bekannten SP 90. Es bietet Ihnen neue Vorteile durch seine lineare Extinktions-Anzeige, die kontinuierliche Skalendehnung, eine neue Lachgasbrenner-Einheit und die eingebaute Flammen-Emissions-Einheit. Zahlreiches Zubehör erweitert die Möglichkeiten: ein automatischer Probenwechsler, eine digitale Anzeige- und Drucker-Einheit, ein Lampenwechsler und ein Mehrschlitzbrenner.

Wellenlängenbereich 190 nm bis 770 nm bzw. 190 nm bis 852 nm; Anschluß für Schreiber.

Anwendung: Agri-Kultur-Chemie, Biochemie, klinische Chemie, Galvanik, Nahrungsmittel, Baumaterialien, allgemeine Industrie-Chemie, Geologie, Metallurgie, Petro-Chemie, Kunststoffe, Wasser-Analysen, Textilien. Damit erschließt die Atomabsorptions-Technik der Analytik neue Möglichkeiten. In den Anwendungslaboratorien in Hamburg und Cambridge werden ständig neue Methoden ausgearbeitet.

Bitte fordern Sie ausführliches Informationsmaterial an. Es liegt für Sie bereit.

Philips Elektronik Industrie GmbH
2000 Hamburg 63 · Röntgenstraße 22
Telefon (0411) 50 10 31

Telefon-Nummern der Büros in: Berlin (0311) 24 59 08, Bielefeld (0521) 2 30 81, Dortmund (0231) 4 19 61, Düsseldorf (0211) 34 60 51, Frankfurt (0611) 7 91 31, Hamburg (0411) 28 92-1, Hannover (0511) 1 66 01, Kiel (0431) 73 23 86, Köln (0221) 51 42 60, Mannheim (0621) 4 20 16, München (0811) 7 67 91, Nürnberg (0911) 46 47 63, Stuttgart (0711) 58 90 81-83.



Analysengeräte

Wir interessieren uns für das Spektral-photometer SP 90 Serie 2 und bitten um

- ☐ Zusendung ausführlicher Unterlagen
- ☐ ein Angebot
- ☐ Besuch Ihres Beratungsingenieurs

Gewünschtes bitte ankreuzen oder ergänzen

PHILIPS

Tab. 6
In vivo-Ergebnisse der Trennung und Bestimmung von markiertem Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4)

Nr.	Isotop	Dosis μ C	Wiederfindung %	PBI %	I- %	T_3 %	T_4 %
1	125 I	300	99,27	15,58	0,95	5,54	78,03
2	125 I	500	99,86	15,27	2,94	—	81,79
3	125 I	500	99,55	9,36	2,82	4,99	82,82
4	131 I	3500	98,38	2,21	1,84	4,31	90,63
5	131 I	4400	97,93	4,55	2,16	3,59	89,70
6	131 I	500	97,69	11,81	—	5,26	83,55
7	131 I	4000	99,40	2,55	0,91	4,43	92,11
8	131 I	700	101,30	11,99	6,30	13,80	67,91
9	131 I	2000	104,90	8,04	3,34	3,42	85,20
10	131 I	700	105,00	6,58	1,82	7,42	84,18
11	131 I	4000	100,10	6,34	1,66	6,74	85,25
12	131 I	700	98,44	0,84	1,86	4,20	93,10
13	131 I	3400	99,75	1,29	1,33	2,78	94,60
14	131 I	8600	102,37	2,63	2,79	5,32	89,26
15	131 I	2500	100,53	1,48	0,81	6,99	90,72
16	131 I	3000	101,62	2,03	1,41	3,18	93,38
\bar{x}			100,38	6,42	2,06	5,12	86,39
Bereich			97,69—105,00	0,84—15,58	0—6,30	0—13,80	67,91—93,38
$S_{\bar{x}}$			$\pm 0,55$	$\pm 1,26$	$\pm 0,36$	$\pm 0,73$	$\pm 1,72$

Bestimmung der Trennung und prozentualen Verteilung des markierten Trijodthyronins und Thyroxins in vivo

Um die gewonnenen Ergebnisse in der Praxis anzuwenden, bestimmten wir die prozentuale Verteilung des im Serum von einigen Kranken mit Hyperthyreose anwesenden Trijodthyronins und Thyroxins.

Zu diesem Zweck ließen wir die Kranken — je nach dem, was für eine Untersuchung oder Isotopentherapie notwendig war — eine die Isotopen 125 I oder 131 I enthaltende Lösung trinken, um 48 Std. später Blut zu entnehmen. Das Serum wurde mit 0,01N NaOH im Verhältnis 1:1 verdünnt und dann eine Stunde lang bei 37° inkubiert. Aus dem Inkubat übertrugen wir 5 ml auf eine 35 × 1,5 cm große Gelfiltrationssäule, 5 ml dienten als Standard. Elution und Messung erfolgten auf die oben beschriebene Art und Weise.

Die so gewonnenen Chromatogramme sind von identischem Charakter und gleichen der in Abbildung 2 veranschaulichten Kurve. Das Chromatogramm besteht aus 4 Gipfeln, die dem an das Eiweiß gebundenen Jod, dem anorganischen Jodid, dem markierten Trijodthyronin und Thyroxin entsprechen. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die gewonnenen Angaben stimmen mit den im Schrifttum veröffentlichten Werten gut überein.

Diskussion

Zur Trennung der im Serum anzutreffenden Schilddrüsenhormone verwendeten wir insbesondere Papier- und Dünnschichtchromatographie. Bei Anwendung dieser Methoden ist bis zu einem gewissen Grad mit Dejodierung zu rechnen. Sie haben ferner den Nachteil, daß sie mit kleinen Substanzmengen arbeiten (max. 0,1 ml), so daß es einer Ausgangssubstanz von großer spezifischer Aktivität bedarf. Das bedeutet jedoch bei diagnostischen, d. h. Untersuchungen in vivo, daß eine große Aktivität von Isotopen zur Anwendung gelangt, oder aber, daß die Kranken einer großen Strahlenbelastung ausgesetzt werden müssen. Zur Vermeidung dieser Nachteile bedienten sich in letzter Zeit mehrere Autoren der Gelfiltrationsmethode. Diese hat den

großen Vorteil, daß viel mehr Untersuchungsmaterial als bei den bisherigen Methoden auf das Gelbett aufgetragen werden kann, und daher eine Ausgangssubstanz von kleinerer spezifischer Aktivität erforderlich ist.

Die bisher beschriebenen Gelfiltrationsmethoden hatten jedoch mehrere Nachteile. MAKOVETZ, MÜLLER und SPRIZY (5) verwendeten zur Trennung des markierten Trijodthyronins und Thyroxins eine 60 × 0,27 cm bzw. 110 × 0,27 cm große Säule. Die Anfertigung solcher Säulen und die Durchführung der Gelfiltration beanspruchen sehr große praktische Erfahrungen. GEHRING (10) trennte die markierten Thyronine auf einer 20 × 1,2 cm großen Sephadex G-15-Säule. Bei dieser Methode bedarf es einer großen Menge Eluens (500—800 ml), und die Gipfel sind nicht so scharf wie bei der Sephadex G-25-Säule. MÜLLER (6) verwendete eine 60 × 1,2 cm und eine 75 × 1,2 cm große Sephadex G-25-Säule, doch fehlte in diesen Fällen ein Teil der Modellversuche.

Bei unseren Versuchen gingen wir von dem Verfahren von MOUGEY und MASON (3) aus, das wir modifizierten. Nach unseren Angaben lassen sich, wenn die Elution auf einer 35 × 1,5 cm großen Sephadex G-25-Säule mit 0,01N NaOH durchgeführt wird, das im Serum anwesende markierte Trijodthyronin und Thyroxin trennen und auch ihre prozentuale Verteilung bestimmen. Anhand von Modellversuchen bestätigten wir, daß es auf einer 35 × 1,5 cm großen Säule mit einer Abweichung $< \pm 5\%$ zur Wiederfindung der dem Serum zugesetzten Thyronine kommen kann.

Die beschriebene Methode hat den großen Vorteil, daß 5 ml auf das Gelbett aufgetragen werden können; auf diese Weise ist es möglich, bei Hyperthyreose die Verteilung sowie das Verhältnis des im Serum anwesenden Trijodthyronins und Thyroxins bereits bei Gaben von 300—500 μ C 125 I zu bestimmen; bei dieser Untersuchung sind die Kranken keiner großen Strahlenbelastung ausgesetzt.

Im Sinne unserer Versuche werden die Trennung und prozentuale Verteilung der im Serum anwesenden

markierten Thyronine durch die anwesenden Tyrosine nicht gestört. Die Menge des im Serum anwesenden Mono- und Dijodtyrosins läßt sich mit der beschriebenen Methode nicht bestimmen, da diese Verbindungen im Einklang mit der Beobachtung MÜLLERS (6) zugleich mit dem anorganischen Jodid eluiert werden.

Im folgenden gilt es zu klären, was die Fraktion des proteingebundenen Jod enthält, die bei Gelfiltration nach vorhergegangener Inkubation mit 0,01N NaOH nachweisbar ist. Diese Fraktion kann mit den mit

Hilfe von Butanol extrahierbaren Jodproteinen identisch sein; es ist aber auch möglich, daß bei der alkalischen Inkubation die Jodtyrösine nicht freigesetzt werden und in demselben Gipfel wie die Jodproteine erscheinen. Gegenwärtig beschäftigen wir uns mit der Prüfung dieser Frage.

Endlich sei noch bemerkt, daß sich die beschriebene Methode auch zur Kontrolle der Reinheit von markierten Trijodthyronin- und Thyroxin-Präparaten eignet.

Literatur

1. TAUROG, A., *Endocrinology* 73, 45 (1963). — 2. TAUROG, A., *Endocrinology*, 73, 57 (1963). — 3. MOUGEY, E. H. und J. W. MASON, *Analytic. Biochem.*, 6, 223 (1963). — 4. LISSITZKY, S. und J. BISMUTH, *Clin. Chim. Acta* (Amsterdam), 8, 269 (1963). — 5. MAKOWETZ, E., K. MÜLLER und H. SPITZY, *Microchem. J.*, 10, 194 (1966). — 6. MÜLLER, K., *Clin. Chim. Acta* (Amsterdam), 17, 21 (1967). — 7. GYERTYÁNFY, G., J. FÖLDES, I. KRASZNAI, L. TIMÁR und E. BARANYI, *Nuclear Medicine* 8, 247 (1969). — 8. ROCHE, J., R. MICHEL, W. WOLFF und J. NUNEZ, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam), 19, 308 (1955). — 9. R. BALOGH, I. und P. KERTAI, *Orv. hétel.* (Budapest), 104, 154 (1963). — 10. GEHRING, D., *Nuclear Medicine* 8, 306 (1969).

G. Gyertyánfy
First Department of Medicine University Medical School
Budapest VIII
Korányi S. u. 2/a
Hungary